

На правах рукописи

**МАЛАНИН СЕРГЕЙ ЮРЬЕВИЧ**

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *THIS ARABIDOPSIS*  
*THALIANA* С ПОМОЩЬЮ ТИАМИНПИРОФОСФАТНОГО  
РИБОСВИЧА**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань 2011

Работа выполнена на кафедре генетики ФГАОУ ВПО «Казанского (Приволжского) федерального университета», г. Казань.

Научный руководитель	- кандидат биологических наук <b>Никифорова Виктория Юлиановна</b>
Научный консультант	- доктор биологических наук, профессор <b>Барабанщиков Борис Иванович</b>

Официальные оппоненты	- доктор биологических наук, профессор <b>Романов Георгий Александрович</b> - доктор биологических наук, профессор <b>Хохлова Людмила Петровна</b>
-----------------------	---

Ведущая организация	Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН г. Казань
---------------------	--

Защита диссертации состоится «24» ноября 2011 г. в 13.00 часов на заседании Специализированного совета Д.212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » октября 2011 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета  
доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Регуляция экспрессии генов является неотъемлемой частью существования любого живого организма. При постоянно изменяющихся условиях внешней среды клетка должна своевременно реагировать специфичными изменениями метаболизма для быстрого и адекватного приспособления. Одним из механизмов подобного контроля является регуляция экспрессии генов, происходящая на всех этапах транскрипции, процессинга и трансляции мРНК. В ходе эволюции возникли разнообразные формы регуляции, где главными “рабочими молекулами” являются белки. В то же время, обнаружены и такие способы контроля работы генов, которые не требуют участия белков, отражающие, возможно, наиболее древние пути регуляции. Среди них можно выделить особый класс рибонуклеиновых регуляторов, названных рибосвичами (riboswitch).

Первоначально обнаруженные в бактериях, рибосвичи представляют собой небольшие участки молекул мРНК, находящиеся, как правило, в 5′ нетранслируемой области, которые способны с высокой селективностью связывать определенные метаболиты и посредством такого связывания влиять на транскрипцию или трансляцию этих мРНК путём образования регуляторных вторичных структур (Winkler, Breaker, 2005). Рибосвич состоит из двух функционально различных доменов: отвечающая за связывание аптамерная часть является наиболее консервативной областью и, связывая определенный метаболит, вызывает конформационные изменения во втором домене – экспрессионной платформе, что приводит к образованию терминаторов/антитерминаторов транскрипции или к блокированию последовательности Шайн-Дальгарно. Таким образом, происходит регуляция транскрипции или трансляции мРНК, содержащих рибосвичи, в зависимости от концентрации лиганда.

В настоящее время у прокариот обнаружено около 10 классов рибосвичей, способных связывать различные молекулы: ион металла (катион магния), нуклеотидные основания (аденин, гуанин), аминокислоты (глицин, лизин), витамины (тиаминпирофосфат, витамин В<sub>12</sub>), коферменты (S-аденозилметионин) и другие метаболиты. Рибосвичи обнаружены в генах, кодирующих белки биосинтеза или транспорта веществ, которые являются лигандами этих риборегуляторов. Каждый класс рибосвичей характеризуется высокой нуклеотидной гомологией аптамерной части, что позволило обнаружить широкое распространение этого способа регуляции у прокариотических организмов.

Наличие полностью секвенированных геномов некоторых эукариот сделало возможным обнаружение одного класса рибосвичей в генах грибов и растений: тиаминпирофосфатный рибосвич (ТПФ рибосвич) – единственный риборегулятор, найденный до настоящего времени в эукариотической клетке (Sudarsan<sup>a</sup> *et al.*, 2003). Следует отметить, что этот тип рибосвичей является наиболее распространенным среди бактерий и первоначально был обнаружен в

опероне *thiCOGE* бактерии *Rhizobium etli*, кодирующем белки биосинтеза тиаминпирофосфата (ТПФ, витамин В<sub>1</sub>). В царстве растений ТПФ рибосвич найден в геноме арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), риса (*Oryza sativa*) и мятлика (*Poa secunda*).

В модельном растении арабидопсиса этот рибосвич находится в 3' нетранслируемой части гена *THIC* (At2g29630), который кодирует фермент, катализирующий синтез пиримидиновой части витамина В<sub>1</sub>. Пре-мРНК данного гена подвергается альтернативному сплайсингу, происходящему в 3' нетранслируемой части гена. Механизм действия ТПФ рибосвича в регуляции экспрессии гена *THIC* оставался неизвестным, но его расположение в пре-мРНК и наличие двух изоформ позволяло предположить, что он действует через регулирование альтернативного сплайсинга и/или стабильности образуемых сплайсинг вариантов.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось определение роли тиаминпирофосфатного рибосвича в регуляции экспрессии гена *THIC Arabidopsis thaliana*, а также установление возможности использования ДНК-тайлинг чипов для поиска новых классов рибосвичей и идентификации генов, регуляция которых может осуществляться с их помощью.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие экспериментальные задачи:

1. Определить изменение экспрессии гена *THIC* при повышении эндогенной концентрации тиаминпирофосфата.
2. Выяснить функциональную значимость тиаминпирофосфатного рибосвича в регуляции экспрессии гена *THIC*.
3. Установить механизм контроля экспрессии гена *THIC* при регулируемом альтернативном сплайсинге.
4. Определить возможность идентификации тиаминпирофосфатного рибосвича с помощью ДНК-тайлинг чипов.
5. Осуществить поиск новых классов рибосвичей у *Arabidopsis thaliana* с использованием S-аденозилметионина как лиганда.

**Научная новизна работы.** В данной работе исследована регуляция гена *THIC* арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) с помощью ТПФ рибосвича, единственного известного до настоящего времени у эукариот. Впервые установлена связь между ТПФ рибосвичем и нонсенс-опосредованным разрушением мРНК (nonsense mediated decay, NMD) в регуляции экспрессии исследуемого гена. Показано, что NMD участвует в деградации нестабильной изоформы, образующейся в результате альтернативного сплайсинга.

Впервые показана возможность использования ДНК-тайлинг чипов в идентификации ТПФ рибосвича в геноме арабидопсиса и определены гены-кандидаты, регуляция которых может осуществляться с помощью S-аденозилметионинового рибосвича.

**Научно-практическая значимость работы.**

Изученный механизм регуляции экспрессии гена *THIS* открывает возможность использования рибосвичей в конструировании искусственных систем у эукариот с контролируемой работой генов, которые найдут применение в научных исследованиях и биотехнологии.

Показана возможность использования технологии ДНК-тайлинг чипов для изучения регуляции альтернативного сплайсинга у растений.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Регуляция экспрессии гена *THIS Arabidopsis thaliana* происходит в результате контроля альтернативного сплайсинга ТПФ рибосвичем и образования нестабильной изоформы.
2. Нестабильная изоформа мРНК гена *THIS* подвергается быстрому разрушению посредством процесса нонсенс-опосредованного разрушения мРНК.
3. С помощью ДНК-тайлинг чипов возможно определение регуляции экспрессии гена *THIS* ТПФ рибосвичем. Этот метод может быть использован для поиска новых классов рибосвичей у растений.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на VI Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2009), 13-ой международной пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009), 5-ой Московской международной конференции «Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development» (Moscow, 2009), Всероссийской конференции «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем» (Уфа, 2009), конференции «Современные проблемы генетики» (Казань, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК: «Физиология растений» и «Ученые записки Казанского государственного университета».

**Место выполнения работы и благодарности.** Работа выполнена на кафедре генетики Казанского (Приволжского) федерального университета. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. В.Ю. Никифоровой за внимательное отношение к работе и обсуждение полученных результатов; д.б.н., профессору Б.И. Барабанщикову за консультации и обсуждение результатов. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории «System Integration» Института молекулярной физиологии растений Общества Макса Планка (г. Гольм, Германия) за предоставление возможности выполнения части экспериментов, за помощь и доброжелательную рабочую атмосферу

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части – описания материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 113 страницах машинописного текста, включает 17 рисунков и 11 таблиц. Список литературы включает 138 источников, из которых 134 – зарубежных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектом исследования** являлось растение арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) экотипа Columbia-0. Растения выращивали в стандартных условиях теплицы при длинном дне (16 часовой фотопериод). Для изучения NMD были использованы инсерционные мутанты арабидопсиса, содержащие Т-ДНК вставку в гене *upfl* (At5g47010). Семена мутантных растений (SALK\_112922) были заказаны в банке семян Nottingham Arabidopsis Stock Centre (Великобритания). В работе использовали только гомозиготные линии. Суспензионная клеточная культура арабидопсиса (экотип Columbia-0) была любезно предоставлена профессором М. Паули (Институт Молекулярной физиологии растений им. Макса Планка) и выращивалась в среде JPL (Jouanneau, Peaud-Lenoel, 1967) при еженедельном пассировании при температуре 20°C и постоянном освещении.

**Манипуляции с нуклеиновыми кислотами.** Выделение геномной ДНК из растений осуществляли с помощью СТАВ буфера (Doyle, Doyle, 1987). Тотальную фракцию РНК получали с использованием реагента TRIZOL (Invitrogen, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью AccuScript транскриптазы (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

Для клонирования использовали систему Gateway (Invitrogen, Германия). Однонуклеотидная мутация в рибосвиче была получена с использованием набора QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США). Дизайн праймеров проводили на сайте Stratagene с помощью программы QuickChange Primer Design Program ([www.stratagen.com](http://www.stratagen.com)), реакции амплификации и дегградации изначальной немутированной плазмиды проводили согласно рекомендациям производителя. Полученный вектор был просеквенирован для проверки наличия однонуклеотидной замены.

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* (DH5α) проводили с использованием набора для выделения плазмид («Plasmid isolation kit», Macherey Nagel, Германия).

**ПЦР в реальном времени.** ПЦР в реальном времени выполняли в 384 луночной плашке с помощью прибора 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Великобритания), используя SYBR Green для мониторинга синтеза ДНК. Анализ данных проводили с помощью программы SDS 2.0 Software (Applied Biosystems). Для нормализации полученных данных использовали значение экспрессии гена убиквитина (At4g05320). Уровень экспрессии измеряемых транскриптов оценивали с помощью формулы:  $40 - dCt$ , где  $dCt$  – это нормализованное количество транскрипта ( $dCt = Ct_{\text{образец}} - Ct_{\text{убиквитин}}$ ).

**Трансформация растений.** Для трансформации растений арабидопсиса использовали бактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101 (коллекция микроорганизмов Института молекулярной физиологии растений им. Макса Планка, Германия). Трансформацию проводили методом *floral dip* (Clough, Bent, 1998).

**Обработка растений тиамином.** Для обработки использовали 4-х недельные растения арабидопсиса дикого типа и инсерционного мутанта (с Т-ДНК вставкой в гене At5g47010). Растения обрабатывали с помощью опрыскивания либо 1 мМ раствором тиамина (Sigma-Aldrich, Германия), либо водой в качестве контроля в течение 72 часов, после чего растительный материал (листья) замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования.

**Обработка суспензионной клеточной культуры метионином.** В 3-х дневную клеточную культуру арабидопсиса добавляли раствор метионина в конечной концентрации 1мМ, либо вода в качестве контроля. После 24 часовой инкубации клеточную культуру фильтровали и замораживали в жидком азоте.

**Обработка ингибиторами транскрипции и трансляции.** 5-и дневную суспензионную клеточную культуру арабидопсиса обрабатывали либо кордицепином (Sigma-Aldrich, Германия) в конечной концентрации 150 мкг/мл, либо смесью кордицепина и циклогексимида (Calbiochem, США) в конечной концентрации последнего 10 мкг/мл. По прошествии 1 и 3 часов после обработок растительный материал фиксировали в жидком азоте для последующего выделения РНК.

**Измерение ТПФ с помощью ВЭЖХ.** Экстракцию ТПФ из растительного материала проводили 0.1 М HCl при температуре 100°C в течение 15 минут. Для окисления витамина В<sub>1</sub> до флуорисцирующего тioxрома использовали 30 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich, Германия). Хроматографию проводили с помощью колонки Reprosil-Pur 120 NH<sub>2</sub> (Dr.Maisch HPLC GmbH, Германия). Измерения были выполнены с использованием хроматографической системы Dionex (Германия). Жидкой фазой служила смесь метанола и 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.5) в соотношении 1.5 к 1. В качестве стандарта проводили измерения тиаминпирофосфата (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 мкМ. Анализ полученных данных проводили с помощью Chromeleon software (Dionex).

**Выделение полисомальной РНК.** Выделение полисом из 4-х недельных растений проводили с помощью ультрацентрифугирования растительных экстрактов в сахарозном градиенте (Jakson, Larkins, 1976; Barkan, 1993; Barkan, 1998).

**Синтез кДНК и дцДНК, фрагментирование и биотинилирование дцДНК для гибридизации с тайлинг чипами, анализ данных.** Для синтеза кДНК и дцДНК из РНК использовали набор GeneChip Tiling WT Double-Stranded DNA Synthesis Kit (Affymetrix, США). Очистку синтезированной дцДНК проводили с помощью GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Для фрагментирования дцДНК и её мечения (биотинилирование) использовали GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit (Affymetrix). Проверку эффективности фрагментирования проводили с помощью 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США).

Гибридизация биотинилированной дцДНК с тайлинг чипами GeneChip Arabidopsis Tiling 1.0R Array (Affymetrix) и сканирование выполнялось в компании Atlas Biolabs (Германия). Нормализацию данных проводили с помощью пакета «normalize.quantiles {affy}» языка программирования R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Определение значений экспрессии генов и уникальных участков изоформ, а также вычисление статистики (Манна-Уитни U-тест) выполняли с помощью программ, написанных на языке Perl ([www.perl.org](http://www.perl.org)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Регуляция экспрессии гена *THIC* происходит с помощью ТПФ рибосвича

Согласно базе данных TAIR ([www.arabidopsis.com](http://www.arabidopsis.com)) ген арабидопсиса *THIC* (At2g29630) имеет две аннотированные изоформы (*THIC-II* и *THIC-III*), образующиеся в результате альтернативного сплайсинга в 3' нетранслируемой части транскрипта. Таким образом, не различаясь в кодирующей области, они обладают различными 3' нетранслируемыми участками (Рис.1). Следует отметить, что ТПФ рибосвич находится в изоформе *THIC-III* в 3' нетранслируемой области.



Рис.1. Две изоформы гена *THIC*: *THIC-II* и *THIC-III*

Светлыми и темными прямоугольниками показаны нетранслируемые и кодирующие последовательности транскриптов соответственно, интроны изображены линиями. Рисунок взят из TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)).

Для определения уровня экспрессии данных изоформ в растениях, выращенных в стандартных условиях, был выполнен ПЦР в реальном времени. Анализ полученных данных показал, что в растительной клетке присутствуют обе изоформы, причем количество транскрипта *THIC-II* больше в 2 раза (Рис.2) (что соответствует одному циклу ПЦР). Присутствие обеих сплайсинг-изоформ свидетельствует о наличии альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *THIC*, причём соотношение образуемых изоформ различно, что говорит о наличии какого-то фактора, определяющего неодинаковый уровень образования двух транскриптов.

Следующим этапом в определении экспрессии двух сплайсинг-изоформ явился анализ трансляции изучаемых мРНК, для чего было выполнено выделение полисомом из растений. Показателем эффективности трансляции служило наличие мРНК в полисомных фракциях. Детекция транскриптов *THIC-II* и *THIC-III* в этих фракциях (Рис. 3) позволяет заключить, что обе изоформы активно транслируются в растительной клетке. Полученные данные свидетельствуют, что, во-первых, ген *THIC* подвергается альтернативному сплайсингу, причём соотношение образуемых изоформ различно; во-вторых,



обе изоформы активно транслируются, но основной вклад в синтез белка вносит, безусловно, изоформа *THIC-II*.

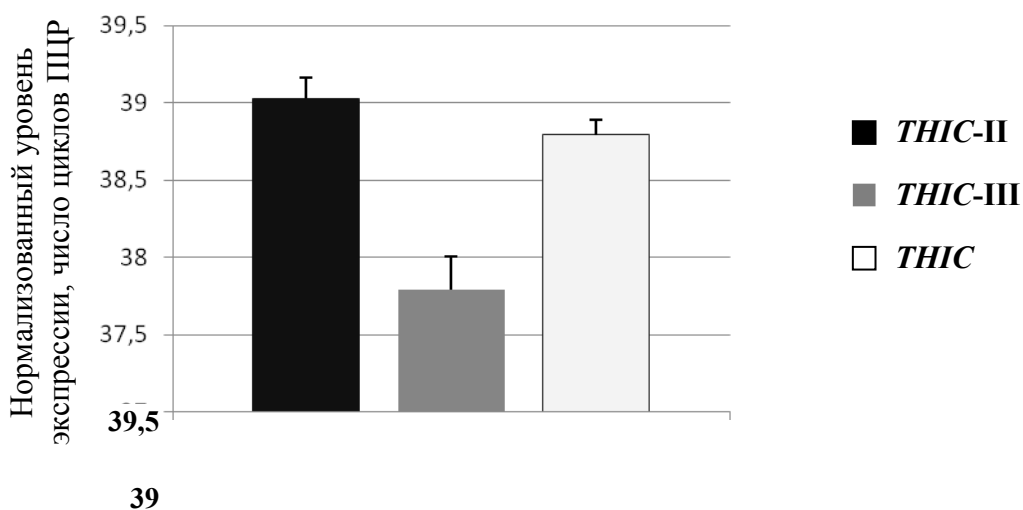


Рис.2. Экспрессия гена *THIC* и двух его изоформ (*THIC-II* и *THIC-III*) представлены средние значения трех измерений количества транскриптов, нормализованных к экспрессии гена у *итина*, и стандартное отклонение.

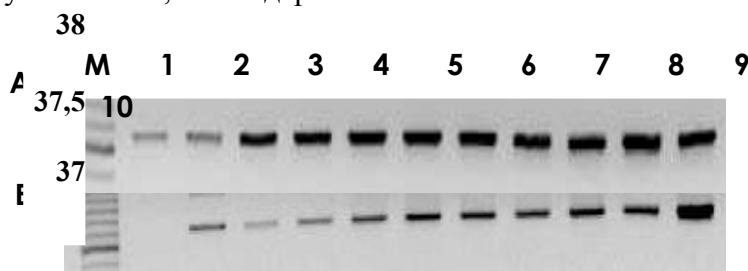


Рис.3. Распределение двух изоформ в полисомных фракциях  
М – маркер, 1-5 – моносомные фракции, 6-10 – полисомные фракции, А и Б изображают *THIC-II* и *THIC-III* изоформы соответственно.

Следующая задача – определение изменения экспрессии двух изоформ при повышении концентрации тиаминпирофосфата (ТПФ) в растении.

Для исследования влияния повышения концентрации ТПФ на экспрессию гена *THIC* были проведены опыты по обработке растений 1 мМ раствором тиамин. Первой задачей было установление увеличения эндогенной концентрации фосфорилированной формы тиамин (ТПФ) после обработки, для чего проводили измерения количества витамина В<sub>1</sub> с помощью ВЭЖХ. Результаты показывают, что после обработки растений раствором тиамин в течение 72 часов происходит увеличение эндогенной концентрации ТПФ (Рис.4). Таким образом, тиамин поступает в растительные клетки, где он фосфорилируется до тиаминпирофосфата – лиганда, связывающегося с рибосвичем.

Следующей задачей был мониторинг экспрессии гена *THIC* (его кодирующей части) и двух изоформ при повышенной концентрации ТПФ в клетке. Для этого после обработок растений в течение 72 часов 1 мМ раствором

тиамина и водой (в качестве контроля) была выполнена ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными для каждой сплайсинг изоформы и для кодирующей части гена, которая является общей для двух образующихся транскриптов и отражает количество мРНК, участвующих в трансляции. Анализ данных показывает, что увеличение эндогенной концентрации ТПФ в растении вызывает уменьшение экспрессии гена *THIS* (Рис.5).

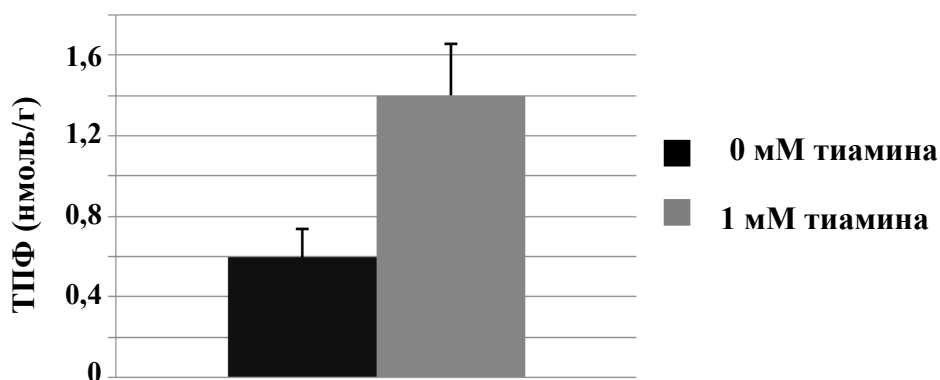


Рис.4. Количество ТПФ в контрольных и обработанных тиаминном растениях. Показано среднее значение четырех измерений со стандартным отклонением.

Полученные данные показывают, что в растении существует такой механизм регуляции гена *THIS*, при котором увеличение количества фосфорилированной формы витамина В<sub>1</sub> вызывает снижение количества транскрипта, кодирующего фермент синтеза ТПФ. Кроме того, анализ данных ПЦР показывает, что обработка растений тиаминном имеет различный эффект на экспрессию двух изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *THIS* (Рис.5). При увеличении концентрации ТПФ количество транскрипта *THIS-II* снижается в 2 раза. В то же время, увеличение концентрации ТПФ не оказывает такого влияния на транскрипт *THIS-III*: напротив, наблюдается даже незначительное увеличение количества этой изоформы. Таким образом, повышение концентрации витамина в растении приводит, во-первых, к уменьшению экспрессии всего гена *THIS* (кодирующей области), во-вторых, к уменьшению количества изоформы *THIS-II*, в-третьих, к незначительному увеличению экспрессии изоформы *THIS-III*.

Суммируя полученные данные, можно утверждать, что экспрессия гена *THIS* в растительной клетке зависит от концентрации ТПФ - конечного продукта метаболического пути, в котором один из ферментов кодируется этим геном. Кроме того, повышение количества данного витамина по-разному влияет на экспрессию двух изоформ, что указывает на связь альтернативного сплайсинга с концентрацией ТПФ.

Следующим этапом работы являлось определение роли ТПФ рибосвича, находящегося в 3' нетранслируемой области изоформы *THIS-III*, в регуляции экспрессии гена *THIS* при изменении концентрации витамина В<sub>1</sub>. Для

доказательства участия ТПФ рибосвича в регуляции работы гена *THIC* были получены векторы, которые позволяли оценить роль изучаемого рибосвича в контроле экспрессии. Векторы содержали маркерный ген (GFP), соединённый с геномной последовательностью 3' нетранслируемой области гена *THIC*, содержащей ТПФ рибосвич. Растения, содержащие трансформированные конструкции, были обработаны раствором тиаминa, и экспрессия GFP оценивалась методом ПЦР. Анализ полученных данных показывает, что обработка ведёт к уменьшению количества транскрипта маркерного гена (Рис.6). Таким образом, можно утверждать, что 3' нетранслируемая область мРНК определяет регуляцию экспрессии гена *THIC* при изменяющейся концентрации витамина В<sub>1</sub>.

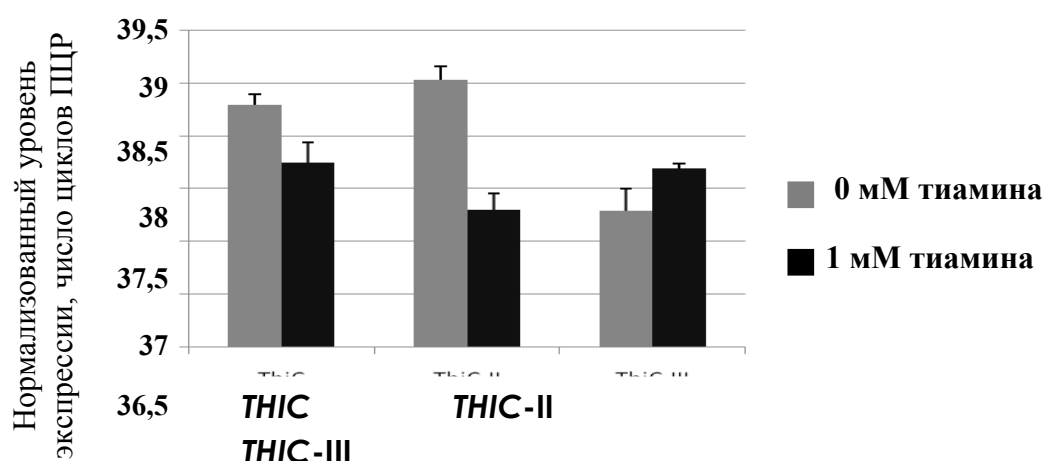


Рис. 5. Экспрессия гена *THIC* и двух его изоформ после 72 часовой обработки растений 1мМ раствором тиаминa

Измерения количества транскриптов проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Показано среднее значение трёх измерений и стандартное отклонение.

Как было сказано ранее, эта область содержит рибосвич, который, возможно, участвует в регуляции экспрессии. Для проверки этого предположения была получена конструкция, содержащая тот же участок геномной ДНК гена *THIC*, но с мутированным рибосвичем: аденин, участвующий в образовании третичной структуры этого риборегулятора (Thore *et al.*, 2006), был заменён на тимин. Такая замена приводила к тому, что рибосвич лишался возможности формировать пространственную структуру, способную проявлять свои регуляторные функции. Растения, содержащие маркерный ген с изменённым рибосвичем, также были обработаны 1 мМ раствором тиаминa, и экспрессию гена GFP оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты показывают (Рис.7), что однонуклеотидная замена в рибосвиче приводит к полной потере регуляции маркерного гена, из-за невозможности образовывать риборегулятором функциональную пространственную структуру, необходимую для регуляции экспрессии гена при изменяющемся уровне ТПФ в клетке. Таким образом, регуляция гена *THIC* при флуктуации концентрации витамина В<sub>1</sub> происходит с помощью ТПФ рибосвича, находящегося в 3' нетранслируемой части гена.

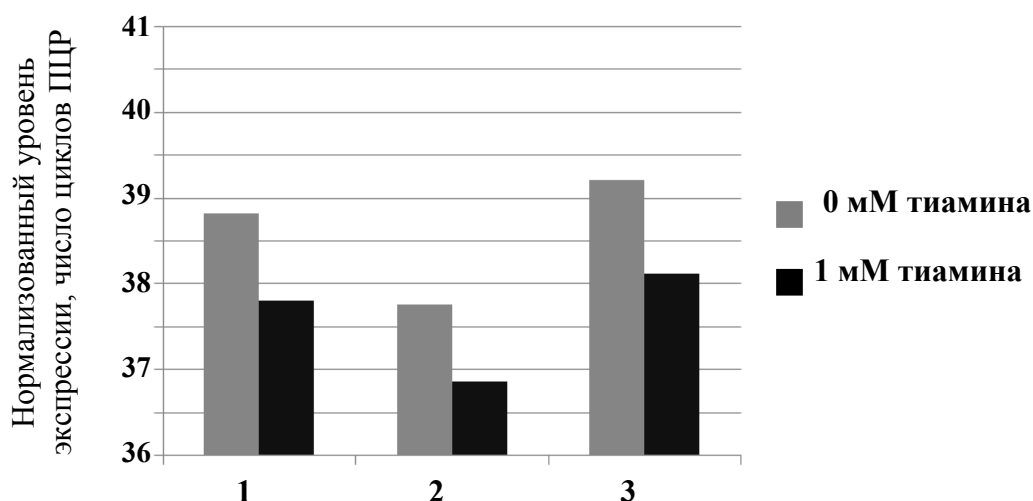


Рис. 6. Экспрессия маркерного гена GFP, соединенного с 3' нетранслируемой областью гена *THIS*, в контрольных и обработанных растениях. На рисунке представлены измерения экспрессии в трех независимых линиях трансформированных растений.

Суммируя полученные данные, можно утверждать, что увеличение эндогенной концентрации ТПФ вызывает уменьшение экспрессии гена *THIS*, причём эта регуляция происходит с помощью рибосвича, который находится в 3' нетранслируемой части. Кроме того, расположение ТПФ рибосвича в пре-мРНК на границе интрон/экзон указывает на его возможное участие в регулировании альтернативного сплайсинга (Рис.8).

Из пре-мРНК гена *THIS* в ходе процессинга образуются две сплайсинг-изоформы: первая изоформа (*THIS*-II) имеет более короткую нуклеотидную последовательность 3' нетранслируемой области и содержит консервативный полиА-сигнал (Рис.8), тогда как изоформа *THIS*-III обладает более длинной 3' нетранслируемой частью, где полиА-сигнал вырезается вместе с интроном (интрон 2 на рис.8). Необходимо также отметить расположение ТПФ рибосвича на молекуле пре-мРНК: находясь частично на границе интрона 2 и экзона, этот риборегулятор имеет возможность влиять на процессинг этого интрона, блокируя один из сайтов сплайсинга. Основываясь на этих фактах, можно представить следующий механизм регуляции экспрессии гена *THIS* при участии ТПФ рибосвича.

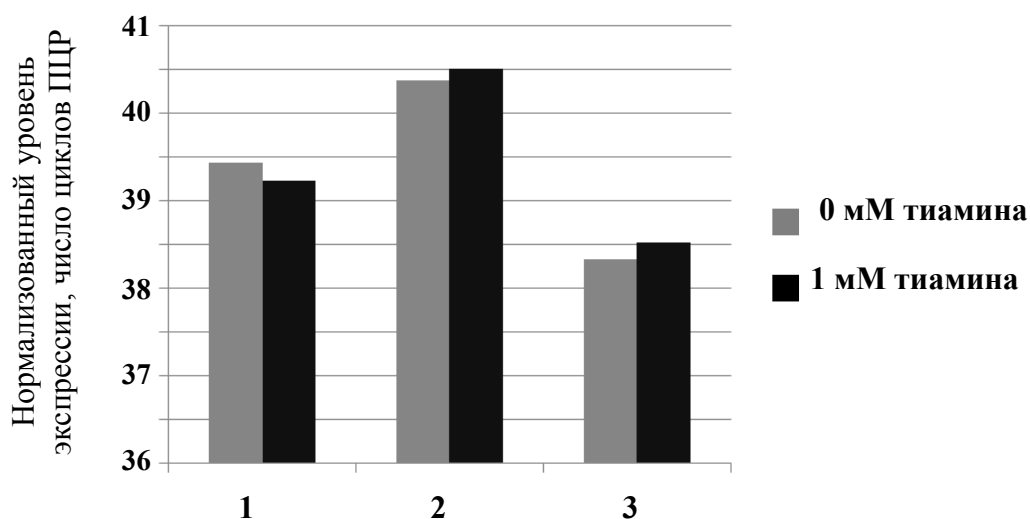


Рис.7. Экспрессия маркерного гена GFP, имеющего 3' нетранслируемую область гена *THIS* с мутацией, препятствующей функционированию рибосвича, в контрольных и обработанных растениях

На рисунке представлены измерения экспрессии в трех независимых линиях трансформированных растений.

Связывание рибосвича с лигандом в зависимости от концентрации последнего может приводить к образованию альтернативной вторичной структуры, которая влияет на эффективность сплайсинга интрона 2, являющегося основным сайтом в определении образования той или иной изоформы из-за присутствия консервативного полиА-сигнала. Полученные данные об увеличении количества транскрипта *THIS*-II при уменьшении концентрации ТПФ (Рис.5) указывают на возможность того, что сплайсинг интрона 2 блокирован и полиА-сигнал остается в транскрипте, образуя изоформу *THIS*-II. При увеличении же концентрации витамина В<sub>1</sub> наблюдается уменьшение количества *THIS*-II, что объясняется прохождением сплайсинга интрона 2, вырезанием полиА-сигнала с образованием более длинной *THIS*-III. Но, как показано на рис. 5, уменьшение количества *THIS*-II не сопровождается пропорциональным увеличением количества *THIS*-III, как следовало бы ожидать из приведенной выше схемы. К тому же, если бы наблюдалось подобное увеличение, то регуляция гена *THIS* не происходила бы при изменении концентрации ТПФ. Для объяснения этого противоречия можно предположить следующую схему: при переключении альтернативного сплайсинга на формирование изоформы *THIS*-III (что происходит при увеличении концентрации ТПФ) этот транскрипт подвергается быстрой деградации, при которой не наблюдается увеличение его количества и происходит уменьшение экспрессии всего гена *THIS*. Для экспериментальной проверки этого предположения следующим шагом было изучение стабильности сплайсинг-изоформ *THIS* гена.

Таким образом, при увеличении эндогенной концентрации ТПФ в растении наблюдается уменьшение экспрессии гена *THIS* и снижение

количества транскрипта *THIS-II*, тогда как количество изоформы *THIS-III* существенно не изменяется. Регуляция экспрессии изучаемого гена при изменении концентрации ТПФ полностью определяется 3' нетранслируемой областью гена, которая содержит ТПФ рибосвич. Полученные результаты полностью соответствуют опубликованным ранее данным по регуляции экспрессии гена *THIS* при изменяющейся концентрации лиганда ТПФ рибосвича (Wachter *et al.*, 2007; Vocobza *et al.*, 2007).

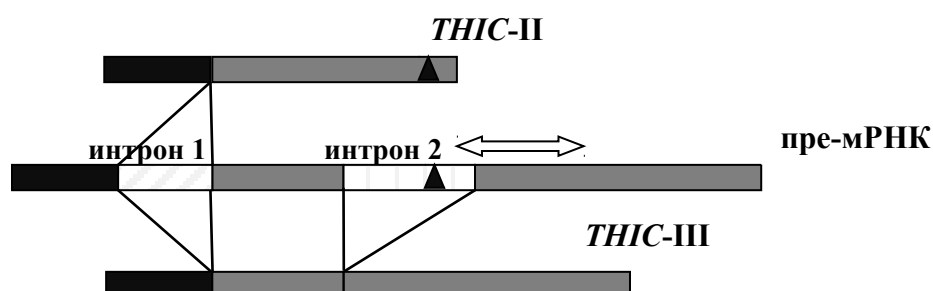


Рис. 8. Схематическое изображение 3' нетранслируемой части гена *THIS*. Черным прямоугольником показана 3' часть кодирующей области гена. Белыми прямоугольниками изображены интроны (интрон 1 и интрон 2). Серыми прямоугольниками – экзоны 3' нетранслируемой части. Треугольником показан полиА-сигнал, стрелкой - ТПФ рибосвич. Интрон 1 вырезается в процессе сплайсинга в обеих изоформах, тогда как интрон 2 в *THIS-II* остается в транскрипте, а в *THIS-III* изоформе удаляется.

## 2. Нонсенс-опосредованное разрушение мРНК (NMD) участвует в деградации *THIS-III* изоформы

Согласно предложенной схеме регуляции экспрессии гена *THIS* одна из его изоформ (*THIS-III*) должна подвергаться быстрому разрушению. Для проверки этого предположения необходимо остановить транскрипцию и оценить число молекул изучаемых мРНК через несколько часов после блокирования синтеза новых транскриптов. В опыте использовалась суспензионная клеточная культура арабидопсиса и ингибитор транскрипции – кордицепин. Клеточная культура обрабатывалась данным ингибитором, и после 1 и 3 часов количество двух изоформ измерялось методом ПЦР в реальном времени. Результаты эксперимента показывают (Рис.9), что остановка транскрипции кордицепином не оказывает существенного влияния на число молекул изоформы *THIS-II*, тогда как количество *THIS-III* уменьшается на 3 цикла ПЦР (что соответствует уменьшению в 8 раз) уже после 1 часа инкубации. Таким образом, резкое падение концентрации изоформы *THIS-III* свидетельствует о низкой стабильности данного транскрипта в растительной клетке.

Из этого следует, что при увеличении концентрации ТПФ в растении и переключении альтернативного сплайсинга на формирование транскрипта *THIS-III* (что означает пропорциональное уменьшение количества *THIS-II*)

происходит его быстрая деградация, обуславливающая уменьшение экспрессии гена *THIC*. Следующим этапом исследования стало определение механизма разрушения изоформы *THIC*-III.

Для определения возможного механизма деградации мРНК необходимо рассмотреть такие характеристики транскрипта *THIC*-III, которые отличают его от *THIC*-II. Все различия двух изоформ между собой заключаются в 3′ нетранслируемой области гена, то есть в том месте, где происходит альтернативный сплайсинг. Не затрагивая возможные регуляторные элементы, которые могут находиться в разных нуклеотидных последовательностях, можно выделить две характерные черты изоформы *THIC*-III: длина 3′ нетранслируемой области и наличие в ней второго интрона.

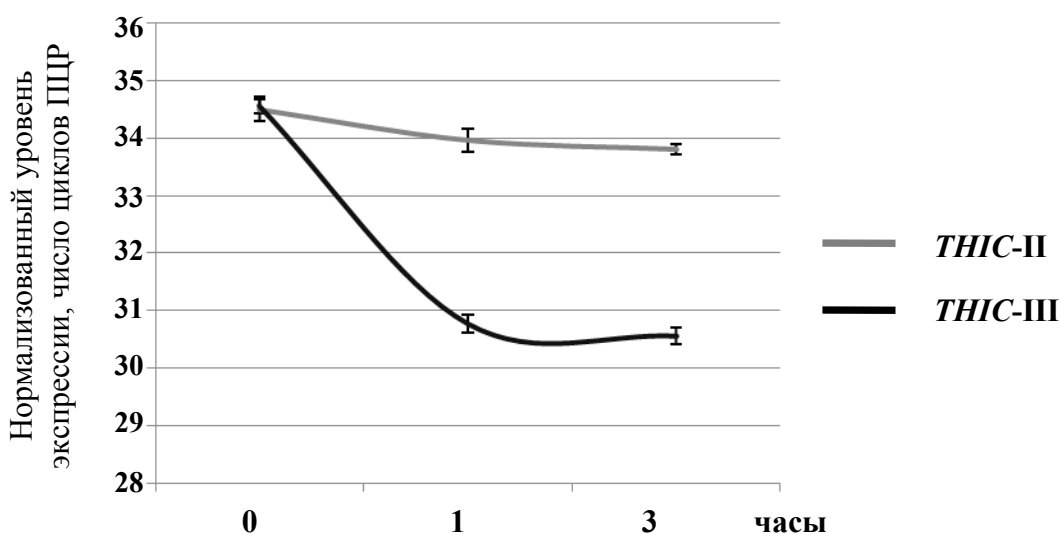


Рис. 9. Стабильность двух изоформ гена *THIC*

На рисунке показаны измерения количества изучаемых транскриптов после 1 и 3 часов обработки ингибитором транскрипции суспензионной клеточной культуры арабидопсиса. Представлены средние значения трех измерений для каждой точки.

Нонсенс-опосредованное разрушение мРНК (NMD) в эукариотической клетке служит для удаления транскриптов, обладающих нонсенс стоп-кодом (или преждевременным стоп-кодом, ПСК), который узнаётся как нонсенс в клетках млекопитающих, если после него до сплайсинга следовал интрон на расстоянии более 55 нуклеотидов (Singh *et al.*, 2003). Изоформа *THIC*-III, в отличие от другой сплайсинг изоформы, имеет интрон, находящийся от стоп-кодона на расстоянии 83 нуклеотида. Таким образом, нормальный стоп кодон может быть узнан как ПСК, и эта РНК потенциально является мишенью для механизма контроля качества транскриптов посредством NMD. Было показано, что длинная нуклеотидная последовательность 3′ нетранслируемой части гена может вызывать нонсенс-опосредованное разрушение мРНК у растений (Kertesz *et al.*, 2006). Длина этой последовательности у *THIC*-III составляет 408 нуклеотидов, тогда как у *THIC*-II — 188 нуклеотидов. Из этого следует, что, обладая такой особенностью, изоформа *THIC*-III может быть объектом для этого механизма разрушения мРНК. Таким образом, транскрипт *THIC*-III

обладает двумя элементами, способными инициировать процесс деградации этой молекулы РНК нонсенс-опосредованным механизмом разрушения: длинной 3' нетранслируемой последовательностью и ПСК.

Для экспериментального подтверждения этой гипотезы использовали растения, содержащие мутацию в ключевом гене NMD-механизма, и ингибитор трансляции, который также полностью блокирует и NMD.

В процессе NMD узнавание транскрипта-мишени, содержащей ПСК, происходит во время трансляции. Используя этот факт, ингибиторы биосинтеза белков часто применяются в изучении этого деградационного процесса: обработка ингибиторами трансляции ведет к остановке разрушения мРНК, имеющей нонсенс стоп-кодон. Для определения механизма деградации изоформы *THIC-III* была использована жидкая клеточная культура арабидопсиса и ингибитор трансляции циклогексимид. Клетки обрабатывали или кордицепином в качестве контроля, или циклогексимидом с кордицепином для определения скорости деградации изучаемого транскрипта в условиях, когда трансляция в клетке блокирована. После 1 и 3 часов инкубации растительный материал был собран, и количество изоформы *THIC-III* была измерена методом ПЦР в реальном времени.

Результаты показывают (Рис. 10), что остановка трансляции действительно блокирует деградацию изоформы *THIC-III*. Таким образом, разрушение этого транскрипта происходит во время биосинтеза белка и может быть связано с нонсенс-опосредованным разрушением мРНК.

Одним из основных белков NMD является UPF1 (up-frameshift protein 1) (Arciga-Reyes *et al.*, 2006). Т-ДНК вставка в гене, кодирующем этот белок, приводит к уменьшению его экспрессии в 32 раза (Рис.11), что в свою очередь должно вести к уменьшению эффективности этого процесса в клетке. Мутантные растения, содержащие Т-ДНК вставку в гене *upf1*, были обработаны 1мМ раствором тиамин, контрольные растения обрабатывали водой. После 72 часов была измерена экспрессия всего гена *THIC* (его кодирующей части) и двух его изоформ.

Полученные данные показывают (Рис. 12), что ингибирование процесса нонсенс-опосредованного разрушения мРНК мутацией никак не затрагивает уменьшение количества изоформы *THIC-II* при увеличении концентрации ТПФ, тогда как количество транскрипта *THIC-III* значительно увеличивается по сравнению с растениями дикого типа (Рис. 5). Из этого следует, что при переключении альтернативного сплайсинга на образование изоформы *THIC-III*, её деградация приостановлена в условиях пониженной эффективности работы механизма нонсенс-опосредованного разрушения мРНК.



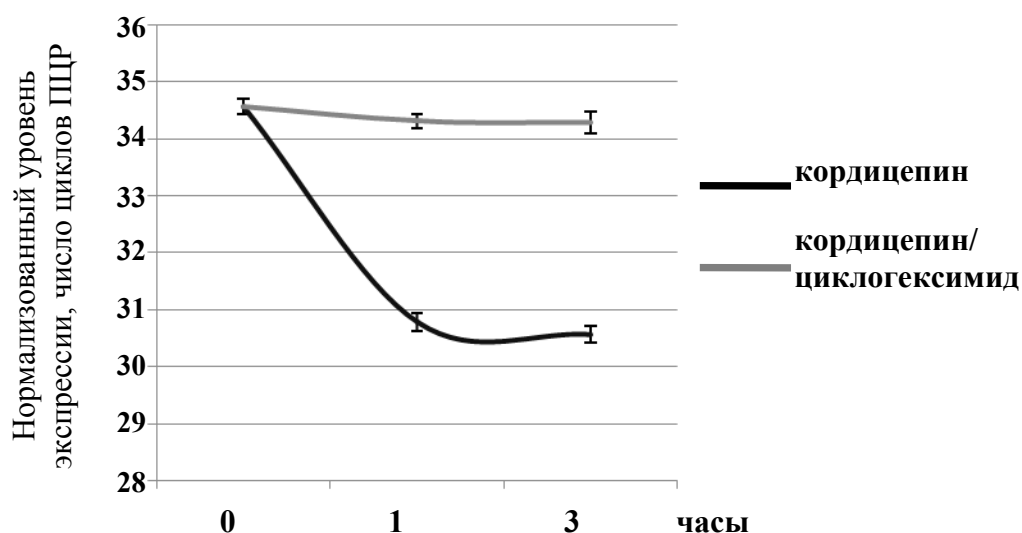


Рис. 10. Стабильность изоформы *THIC*-III при обработке суспензионной клеточной культуры арабидопсиса ингибиторами транскрипции и трансляции. Показано среднее значение трёх измерений и стандартное отклонение.

Таким образом, в условиях замедления деградации изоформы *THIC*-III должна быть нарушена и регуляция всего гена. Измерения экспрессии всего гена *THIC* (Рис. 12) демонстрируют такое нарушение в регуляции гена при изменении эндогенной концентрации ТПФ.

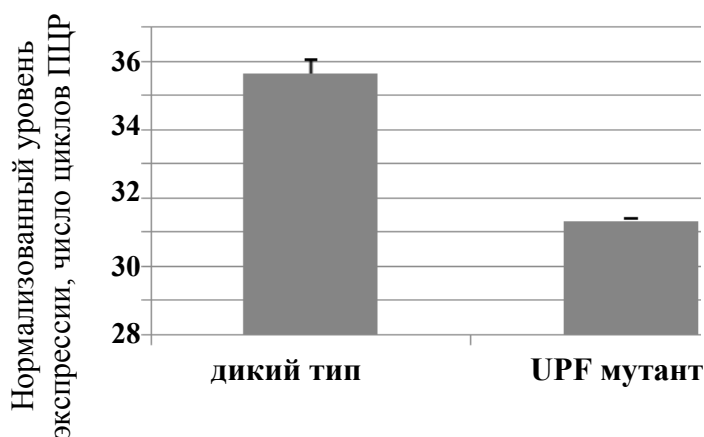


Рис. 11. Уровень экспрессии гена *upf1* в растениях дикого типа и в мутантных растениях, содержащих Т-ДНК вставку

Таким образом, установлено, что изоформа *THIC*-III является нестабильным транскриптом. Характерные особенности данного транскрипта указывают на возможность его деградации с помощью нонсенс-опосредованного разрушения мРНК. Ингибирование трансляции ведёт к остановке деградации изоформы *THIC*-III. В растениях-мутантах по нонсенс-опосредованному разрушению мРНК нарушена регуляция гена *THIC* и деградация изоформы *THIC*-III.

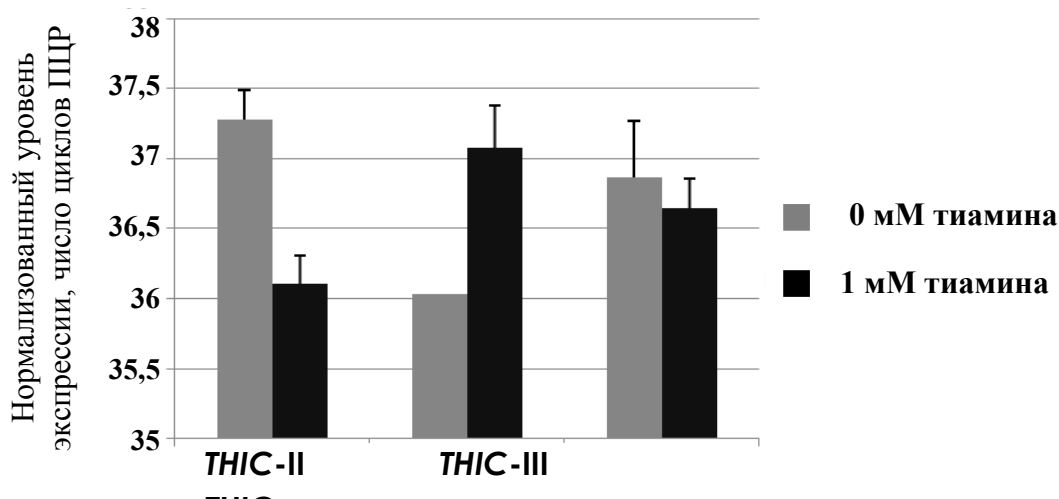


Рис. 12. Изменение экспрессии гена *THIC* и двух его изоформ в растении-мутанте по NMD при увеличении концентрации тиамина. Показано среднее значение трех измерений.



Рис. 13. Схема регуляции экспрессии гена *THIC* ТПФ рибосвичем и NMD

Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что регуляция экспрессии гена *THIC* происходит с помощью функционирования ТПФ рибосвича и деградации изоформы *THIC*-III процессом нонсенс-опосредованного разрушения мРНК (Рис. 13).

### 3. Поиск новых классов рибосвичей в геноме растений арабидопсиса с помощью ДНК-тайлинг чипов

Согласно базе данных TAIR8 ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) арабидопсис содержит в ядерном геноме 33003 гена, из которых 4330 гена подвергаются альтернативному сплайсингу. Данный механизм затрагивает различные участки

пре-мРНК (5' и 3' нетранслируемые области, кодирующие участки) и ответственен за образование 2 и более изоформ мРНК (генных моделей) у каждого гена. Различные изоформы одного гена характеризуются наличием уникальных нуклеотидных последовательностей, которые могут использоваться для мониторинга экспрессии каждой изоформы. В данной работе были использованы ДНК-тайлинг чипы (GeneChip Arabidopsis Tiling 1.0R Array (Affymetrix)), содержащие 3,2 миллиона проб длиной в 25 нуклеотидов и расстоянием между соседними пробами в 10 нуклеотидов. Такой дизайн ДНК чипа дает возможность оценить экспрессию гена на всей её протяженности, специфично определяя, где это возможно, ввиду длины специфического участка, количество сплайсинг изоформ.

Для поиска генов, экспрессия которых может регулироваться за счет активности рибосвича при изменении внутриклеточной концентрации его лиганда, были использованы два метаболита: известный регулятор гена *THIS* – тиаминпирофосфат, а также S-аденозилметионин (SAM). Обработка растений тиаминном и последующее изучение активности генов с помощью тайлинг чипов позволяет оценить возможность использования этого метода в поиске генов, экспрессия которых регулируется посредством изменения количественного соотношения изоформ вследствие функционирования рибосвича. В свою очередь SAM играет важную роль в метаболизме серы в растении и является лигандом для многочисленных SAM-рибосвичей у бактерий (Wang *et al.*, 2008).

В данной работе было показано, что регуляция экспрессии *THIS* гена при изменении внутриклеточной концентрации ТПФ происходит с помощью рибосвича, ответственного за контроль альтернативного сплайсинга в данном гене. Посредством ПЦР в реальном времени установлено, что при увеличении концентрации лиганда ТПФ рибосвича наблюдается уменьшение образования короткой изоформы (*THIS*-II), тогда как количество длинной изоформы существенно не изменяется. Таким образом, изученный механизм регуляции гена *THIS* позволяет оценить возможность использования ДНК-тайлинг чипов в поиске генов, активность которых определяется тем же механизмом.

Для определения эффекта увеличения концентрации ТПФ на экспрессию гена *THIS* с помощью ДНК-тайлинг чипов рассматривались две характеристики: изменение количества мРНК двух изоформ после обработки растений лигандом ТПФ рибосвича, измеренное с учетом всех проб тайлинг чипа, комплементарных исследуемым нуклеотидным последовательностям и с учетом только тех проб, которые находятся в границах уникальных участков изоформ. Полученные результаты по гену *THIS* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Изменение экспрессии гена *THIS*, определенное с помощью

### ДНК-тайлинг чипов

изоформы	изоформа		Уникальная последовательность изоформы		
	экспрессия	p	экспрессия	p	количество проб
<i>THIS-II</i>	0.5551	0.0102	3.6842	1	2
<i>THIS-III</i>	0.8195	0.0747	2.7235	0.6813	9

экспрессия – соотношение значений экспрессий (интенсивности проб) в обработанных и контрольных растениях. p – уровень значимости, вычисленное с помощью Манна-Уитни U-теста.

Как видно из результатов, представленных в таблице 1, обработка растений тиамином ведет к уменьшению экспрессии изоформы *THIS-II* в 1.8 раз (соотношение количества мРНК в обработанных и контрольных растениях равно 0,5551). Тогда как менее выраженное уменьшение количества изоформы *THIS-III* статистически незначимо. Таким образом, определение эффекта увеличения концентрации ТПФ на экспрессию двух изоформ гена *THIS*, измеренное с учетом всех проб тайлинг чипа, которые находятся в границах изучаемых транскриптов, соответствует данным, полученными для изоформ с помощью метода ПЦР в реальном времени. Анализ же результатов, полученных при использовании проб, специфичных только для уникальных последовательностей изоформ, показывает большую зависимость результатов от количества проб: на изоформу *THIS-II* приходится 2 уникальные пробы, что делает невозможным установление статистически значимых значений. Расчет экспрессии по 9 уникальным для изоформы *THIS-III* пробам демонстрирует статистически незначимое увеличение количества исследуемого транскрипта, что соответствует данным ПЦР в реальном времени: обработка растений тиамином не вызывает существенного изменения экспрессии изоформы *THIS-III*. Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что одним из методов определения изменения количества изоформ является использование всех проб, комплементарных к изучаемым транскриптам, тогда как вычисление экспрессии по уникальным участкам возможно только при наличии либо большого количества проб, специфичных для данных регионов мРНК, либо четкого сигнала с тайлинг чипа.

Результаты анализа изменения экспрессии гена *THIS*, определенной с помощью ДНК-тайлинг чипов, позволяют предложить следующую схему поиска генов-кандидатов:

1. Выделение генов, в которых изменение экспрессии, рассчитанное с использованием всех проб, находящихся в границах транскриптов, затрагивает только одну изоформу.
2. Идентификация генов, в которых только одна изоформа изменяет экспрессию, определенную с помощью проб, комплементарных уникальным последовательностям транскриптов.

3. Определение изоформ, в которых экспрессии, высчитанные с учетом уникальных проб и проб, находящихся в границах всего гена, различаются.
4. Поиск генов, изоформы которых имеют относительно длинную уникальную нуклеотидную последовательность, но не обладающие значимыми изменениями количества, тогда как сами гены характеризуются статистически значимыми повышением или уменьшением экспрессии.

В результате использования нескольких способов идентификации генов, в которых наблюдается различная экспрессия изоформ при увеличении внутриклеточной концентрации лигандов, было идентифицировано несколько десятков кандидатов: обработка тиамином – 33 гена, метионином – 42 гена. Для подтверждения выявленных изменений в различной экспрессии изоформ необходимо проведение ПЦР в реальном времени. После доказательства полученных данных необходимы исследования для выявления специфичности наблюдаемых изменений, поскольку регуляция альтернативного сплайсинга может быть и не связана с функцией рибосвича.

## ВЫВОДЫ

1. Процессинг пре-мРНК гена *THIS* сопровождается альтернативным сплайсингом с образованием различных количеств изоформ *THIS-II* и *THIS-III*.
2. Обработка растений тиамином, приводящая к увеличению эндогенной концентрации тиаминпирофосфата, вызывает уменьшение экспрессии гена *THIS*.
3. Повышение эндогенной концентрации тиаминпирофосфата сопровождается уменьшением количества изоформы *THIS-II*, тогда как содержание изоформы *THIS-III* существенно не изменяется.
4. Тиаминпирофосфатный рибосвич принимает непосредственное участие в регуляции экспрессии гена *THIS* при увеличении концентрации своего лиганда.
5. Установлено, что изоформа *THIS-III* является нестабильным транскриптом и быстро деградирует с помощью нонсенс-опосредованного разрушения мРНК.
6. Показана возможность обнаружения тиаминпирофосфатного рибосвича с помощью ДНК-тайлинг чипов.
7. Идентифицированы гены-кандидаты, у которых регуляция альтернативного сплайсинга может осуществляться посредством функционирования S-аденозилметионинового рибосвича.

## Работы, опубликованные по теме диссертации

1. **Маланин С.Ю.** Связь альтернативного сплайсинга и нонсенс-опосредованного разрушения мРНК (NMD) в регуляции экспрессии гена *THIS*

у арабидопсиса / Маланин С.Ю., Никифорова В.Ю. // Физиология растений. – 2010. – Т.57, кн.2. – С.: 280-286.

2. **Маланин С.Ю.** Рибосвичи – новый класс регуляторов генной активности / Маланин С.Ю., Барабанщиков Б.И. // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Т.153, кн. 2. – С.: 73-88.

3. **Маланин С.Ю.** Особенности регуляции экспрессии гена биосинтеза тиамин у *Arabidopsis thaliana* / Маланин С.Ю., Барабанщиков Б.И. // Труды Всероссийской конференции «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем». – Уфа, 2009. – С.: 94-100.

4. **Маланин С.Ю.** Процесс нонсенс-опосредованного разрушения мРНК в арабидопсисе осуществляется посредством декэппирования транскриптов / Маланин С.Ю., Никифорова В.Ю. // Материалы VI Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». – Минск, 2009. – С.: 57-58.

5. **Маланин С.Ю.** Роль активной трансляции в нонсенс-опосредованном разрушении мРНК у растений / Маланин С.Ю., Никифорова В.Ю. // Сборник тезисов 13-ой международной пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушкино, 2009. – С.: 27-28.

6. **Malanin S.J.** Tiling arrays in search for the new regulation modes of eukaryotic gene expression / Malanin S.J., Childs L., Walther D., Nikiforova V.J. // The Fifth Moscow International Congress “Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development”. – Moscow, 2009. – С.: 68-69.

7. **Маланин С.Ю.** Регуляция экспрессии гена THIC в арабидопсисе: взаимодействие ТПФ рибосвича и процесса нонсенс-опосредованного разрушения мРНК / Маланин С.Ю., Никифорова В.Ю. // Сборник материалов научной конференции «Современные проблемы генетики». – Казань, 2011. – С.: 31-33.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПСК – преждевременный стоп-кодон

ТПФ – тиаминпирофосфат

GFP – зелёный флуоресцентный белок

NMD – нонсенс-опосредованное разрушение мРНК

SAM – S-аденозилметионин

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, отдел службы аттестации, ученому секретарю Диссертационного совета Д.212.081.08. Абрамовой Зинаиде Ивановне и по факсу: (843) 238-76-01.

Отпечатано в типографии  
«Деловая полиграфия»  
420111, г. Казань, ул. М. Межлаука, 6  
т/ф (843) 292-08-43  
e-mail: minitipografia@list.ru

Подписано в печать 20.10.2011 г.  
Бумага офсетная Тираж 100 экз.  
Заказ № 169/2011